Aus dem Department of Microbiology des Presbyterian - St. Luke's Hospital, Chicago, U.S.A.
Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich Deinhardt
und dem
Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER WACHSTUMVERHALTEN UND CYTOPATHOLOGIE EINIGER HERPESVIREN IN VERSCHIEDENEN GEWEBEZELLKULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Tischendorf
aus Leipzig

1966

Aus dem Department of Microbiology des Presbyterian - St. Luke's Hospital, Chicago, U.S.A.

Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich D e i n h a r d t

und dem

Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin.

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard S c h m i d t

Vergleichende Untersuchungen über Wachstumverhalten und Cytopathologie einiger Herpesviren in verschiedenen Gewebezellkulturen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter T i s c h e n d o r f

aus Leipzig.

Dekan: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

Referent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Korreferent: Professor Dr. med. Wolfdietrich Germer

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 8.7.66

Zur Taxonomie der Viren sollen nach dem Beschluß von Montreal im Jahre 1962*) künftig die in Tabelle I aufgeführten Kriterien gelten. Danach zeigt etwa ein Dutzend Viren, die ihren natürlichen Wirt im Tierreich suchen, auf Grund physikalisch-chemischer Eigenschaften engste Verwandtschaft mit dem Herpesvirus hominis, und es wurde vorgeschlagen, sie alle in der "Herpesgruppe" zusammenzufassen (Andrewes, 1964; Wilner, 1964). Bisher sind nur wenige Arbeiten über eine vergleichende Cytopathologie dieser Viren veröffentlicht worden. Nachdem in unseren Laboratorien ein für Neuweltaffen tödliches Virus isoliert werden konnte (Holmes, Deinhardt et al.,1963), das auf Grund biologisch-physikalischer Eigenschaften ebenfalls die Zuordnung zur "Herpesgruppe" rechtfertigt (Holmes, Deinhardt et al., 1964; Melnick et al., 1964), interessierte es uns, was den einzelnen Vertretern dieser Virusgruppe gemeinsam ist und was sie unterscheidet in Hinblick auf:

A.) ihre Affinität zu verschiedenen Gewebezellkulturen,

B.) den cytopathologischen Effekt (CPE), den sie in verschiedenen Gewebezellkulturen hervorrufen und

C.) ihre mögliche Variation in der Ausbildung intranukleärer Einschlüsse nach Anwendung verschiedener Fixierungsmittel und verschiedener Färbemethoden.

---

*) Int.Bull.bact.Nomencl. 13, 217-222 (1963)

Tabelle I

Virus Synonym	(Abk.)	isoliert von	1. Nucleinsäuretyp	2. Größe in um	3. Ätherempfindlichkeit	4. Morphologie		
						Zahl der Membranen	Zahl der Capsomeren	Symmetrie
1. Herpesvirus hominis Herpes simplex	(HS)	Grüter 1912	DNA	120-130	pos.	1 - 2	162	icosahedral
2. Herpesvirus suis Pseudorabies	(PR)	Aujeszky 1902	DNA	100-150	pos.	1 - 2	162	"
3. Herpesvirus platyrrhinorum Marmoset Virus	(HP)	Holmes Deinhardt et al.1963	DNA	110	pos.	1 - 2	162	"
4. Equine herpes virus Typ I Equine abortion virus	(EAV)	Dimock u. Edwards 1933	DNA	90-146	pos.	1 - 2	162	"
5. Equine herpes virus Typ II LK - Virus	(LK)	Plummer u. Waterson. 1963	DNA	ähnlich 4. (EAV)	pos.	1 - 2	wahrscheinlich 162	"

Bei unseren experimentellen Versuchen beschränkten wir uns auf fünf Vertreter der Herpesgruppe (s.Tabelle I):

ad 3. Herpesvirus platyrrhinae (HP): Dieses wurde ursprünglich bei routinemäßigen Nasenabstrichen und aus Sektionsmaterial bei zwei Arten von Neuweltaffen (Saguinus (Tamarinus) nigricollis und Saguinus oedipus (Marmoset)) isoliert und als Herpesvirus tamarinus bzw. Marmoset Herpesvirus beschrieben (Holmes et al., 1963, 1964; Melnick et al., 1964). Die Infektion der Saguinus sp. und auch Aotes sp. führt zu einer generalisierten und fast immer tödlichen Erkrankung mit Organnekrosen, die im Ausmaß und der Verteilung denen des Herpes neonatorum hominis (Hass,1935) sehr ähnlich sind. Deshalb können die genannten Gattungen wahrscheinlich nicht als natürliche Wirte angesehen werden(Deinhardt, 1965). Jedoch andere Gattungen der Neuweltaffen (Platyrrhinae), nämlich Saimiri sp., Ateles sp. und wahrscheinlich auch Cebus albifrons ,beherbergen das untersuchte Virus in einem latenten Stadium mit hoher Durchseuchungsquote der älteren Tiere (ähnlich der B-Virus-Infektion der Rhesusaffen), so daß die Bezeichnung Herpesvirus platyrrhinae für das zur Diskussion stehende Virus geeigneter erscheint (Deinhardt, 1965).

ad 4. Equine herpes virus Typ I (EAV): Ruft bei Pferden Rhinopneumonitis hervor (Doll, 1957). Bei graviden Stuten kann es u.U. Abort verursachen. Dann zeigen die verworfenen Fohlen histologisch in verschiedenem Ausmaße Organnekrosen (Westerfield et al, 1946), die ebenfalls denen der generalisierten HS-Infektion sehr ähnlich sind.

ad 5. Equine herpes virus Typ II (LK): Konnte aus dem Nasenabstrich eines Pferdes, das an Husten und Schnupfen litt, isoliert werden- ist aber serologisch nicht mit dem EAV verwandt- (Plummer u. Waterson, 1963).

Material und Methodik

1. Zellkulturen

Primärzellkulturen: Kaninchen-, Marmoset- und menschliche Nierenzellen wurden im wesentlichen nach der von Youngner (1954) beschriebenen Methode mit Trypsin aufbereitet. Als Wachstumsmedium verwendeten wir 90% "improved basal medium Eagle" (BMEI) (Eagle, 1957), in physiologischer Hanks-Lösung (H) und 10% fötales Kälberserum (FK). Das Erhaltungsmedium für Kaninchen- und menschliche Nierenzellen bestand aus 95% "essential medium Eagle" (BME) in physiologischer Earls-Lösung (E) und 5% FK, während das Erhaltungsmedium für Marmosetnierenzellen aus "Medium No.199"

(Morgan, 1950) bestand mit einem Zusatz von 5% FK und 0,5% Lactalbumin-Hydrolisat. Nierenzellen von Rhesusaffen wurden kommerziell von Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, bezogen und erhielten als Erhaltungsmedium das gleiche Medium, das für Marmosetnierenzellen verwendet wurde.

Diploide Zellkulturen: Menschliche Embryonalzellen (human embryonic diploid cell strains) wurden nach der von Hayflick und Moorehead (1961) beschriebenen Methode gezüchtet. Als Wachstumsmedium diente 85% BMEI-H, 5% FK und 10% Pferdeserum. Als Erhaltungsmedium diente 95% BMEI-E und 5% FK.

Permanenter Zellstamm: Eine Kultur vom Hep-2 Zellstamm (Moore et al., 1955) bekam als Wachstumsmedium BME-H, als Erhaltungsmedium BME-E mit je 10% Pferdeserum.

Alle Medien enthielten pro ml 100 I.E. Penicillin, 50 Microgramm Streptomycin und 5 Microgramm Fungizone.

Der pH-Wert der verschiedenen Medien wurde durch Zugabe einer 7,5%igen Natriumbikarbonatlösung auf einen Wert zwischen 7,2 und 7,5 gebracht.

Teströhrchen wurden jeweils mit 1 ml Medium beschickt, während "Leighton tubes" für die späteren Kernfärbungen mit 1,5 ml Medium beschickt wurden.

2. Herkunft der untersuchten Viren

Herpesvirus hominis (HS): der Stamm HF-CAM wurde von der American Type Culture Collection bezogen.

Herpesvirus platyrrhinae (HP) wurde am Presbyterian St.Luke's Hospital bei Neuweltaffen (Saguinus sp.) isoliert (Holmes et al., 1963).

Herpesvirus suis (PR) wurde uns freundlicherweise von Prof.T.F. McNair Scott, The Children's Hospital, Philadelphia, Pa., überlassen.

Equine herpes virus Typ I (EAV): Zwei Hamster-adaptierte Stämme (Army 183 und Ky-D) wurden uns freundlicherweise von Prof.J.T. Bryans, University of Kentucky, Lexington, Ky., zur Verfügung gestellt.

Equine herpes virus Typ II (LK): Prof. G. Plummer, Beckenham, England, überließ uns freundlicherweise das von ihm isolierte Virus (Plummer und Waterson, 1963).

Das Virusmaterial wurde in Ampullen zu je 0,5 ml bei einer Temperatur von -.65° C aufbewahrt.

3. Virustitrationen

Für die Virustitrationen wurden Verdünnungsreihen in Zehnerpotenzen in Hanks Lösung hergestellt. Je zwei Gewebekulturröhrchen wurden mit dem Material aus einem Röhrchen der Verdünnungsreihe beimpft. Der Titrationsendpunkt wurde nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen auf Grund des typischen CPE ermittelt.

4. Fixierungen und Färbungen

Als Fixierungsmittel für die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) verwendeten wir vergleichsweise Methylalkohol, 10% Formalin oder Zenker-Lösung. Die Fixierzeit lag zwischen 5 und 10 Minuten. Die für die Acridin-Orange-Färbungen (AO) bestimmten Kulturen wurden mit essigsaurem Alkohol fixiert, mit 0,001% Acridin-Orange gefärbt und mit einem Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3,8) gewaschen - nach der von Starr et al. (1960) beschriebenen Methode.

Versuchsergebnisse

.) Affinität der untersuchten Viren zu verschiedenen Gewebezellkulturen.

Während Herpes simplex (HS), Pseudorabies (PR) und Herpesvirus platyrrhinae (HP) durch vorhergegangene Experimente in unseren Laboratorien schon weitgehend adaptiert waren, mußten die bis dahin nur für Hamster pathogenen Equine abortion virus (EAV) - Stämme Army 183 und Ky-D erst an Gewebezellkulturen adaptiert werden:

Der EAV-Stamm Ky-D wurde gleichzeitig auf eine menschliche Embryonalzellkultur und eine menschliche Nierenzellkultur geimpft. Die menschliche Embryonalzellkultur zeigte nach 1o Tagen Inkubation noch keinen CPE, wohl aber die menschliche Nierenzellkultur. Von dieser wurden schnelle Passagen parallel laufend auf Nierenkulturen vom Menschen und vom Kaninchen gemacht. Während bei den früheren Passagen nur höchstens 5o% aller Zellen einen CPE zeigten, war von der 1o. Passage an der weiter unten beschriebene CPE voll ausgeprägt und gleichmäßig über den ganzen Zellrasen verteilt.

Ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigte der EAV-Stamm Army 183 und Equine herpes virus Typ II (LK).

Als Kriterium für den Grad der Adaptation der untersuchten Viren an verschiedene Zellkulturen, legten wir die Titerendpunkte zu Grunde. Zu diesem Zweck führten wir mit dem gleichen Virusinokulat Titrationen in den 6 verschiedenen obengenannten Gewebezellkulturen gleichzeitig durch und ermittelten den Titerendpunkt nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen auf Grund des typischen CPE. Das Ergebnis einer dieser Vergleichstitrationen ist in Tabelle II wiedergegeben.

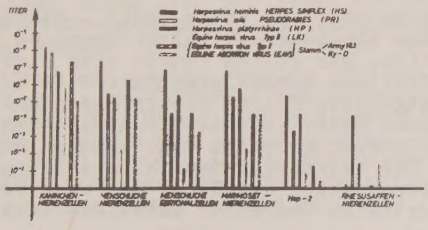


Tabelle II

Bei weiteren Experimenten ergaben sich zwar andere Absolutwerte, aber eine in den meisten Fällen gleiche Relation der einzelnen Titer eines Virus in den verschiedenen Gewebezellkulturen, wie bei dem in Tabelle II aufgezeigten Versuch.

Alle untersuchten Virusstämme weisen in den Primärkulturen gutes Wachstum mit verhältnismäßig hohem Titer auf. Ausnahmslos bestes Wachstum aller 6 Viren zeigt die Kaninchennierenkultur. Darauf folgen mit etwas abfallendem Titer Nierenkulturen vom Menschen und Marmoset sowie menschliche Embryonalzellkulturen. Der permanente Zellstamm Hep-2 zeigte sehr unterschiedliche Titer: Leicht abgeschwächt für HS, HP und PR, stark abgeschwächt für LK u. Army 183, kein CPE nach Infektion mit Ky-D (was jedoch mit dem in diesem Versuch, im Vergleich zu Army 183, etwas niedrigerem Titerendpunkt vereinbar ist). Äußerst unterschiedliches Verhalten den einzelnen Viren gegenüber zeigt die Rhesusaffennierenkultur.

B.) CPE der untersuchten Viren in verschiedenen Gewebezellkulturen.

Bei den mit Herpes simplex (HS) infizierten Kulturen treten die cytopathologischen Veränderungen über den ganzen Zellrasen verteilt ziemlich gleichmäßig auf. Die einzelnen Zellen runden sich ab, erscheinen scharf konturiert und pigmentiert und bilden vereinzelt mehrkernige Riesenzellen. Während die Hep-2-Zellkultur die Riesenzellbildung als letztes Stadium vor der Ablösung von der Glaswand zeigt (Abb.1), lösen sich in den mit HS beimpften Kaninchennieren- und in den menschlichen Embryonalzellkulturen die Grenzen der Riesenzellen auf, um mit benachbarten Riesenzellen zu verschmelzen. Die Zellkerne in diesen großflächigen amorphen Gebilden scharen sich zusammen und sind von Cytoplasma umgeben. Das Endstadium ist durch Schrumpfung gekennzeichnet: Die bis dahin völlig homogenen Gebilde, die Vakuolen und Pigmentierungen zeigen können, gehen mit dem Fortschreiten des CPE in scharf begrenzte Syncytien über, die durch immer schmäler werdende Protoplasma"brücken" miteinander verbunden sind (Abb.2).

In den mit Pseudorabies (PR) infizierten Zellkulturen setzt der CPE etwas später ein als bei den mit HS infizierten Kulturen (auch wenn PR am 7. Tag der Ablesung des CPE einen höheren Titerendpunkt besitzt als HS zum gleichen Zeitpunkt) und ist im Anfangsstadium mehr lokal, d.h. auf einzelne Areale des Zellrasens begrenzt. Die Zellen eines solchen oft scharf umschriebenen und sich ständig vergrößernden Areals runden sich ab, verschmelzen teilweise zu Riesenzellen und lassen in der Mitte einen kleinen Hof von der Glaswand abgefallener Zellen frei. Die weitere Entwicklung ist der des HS ähnlich, nur geht das Fortschreiten der Nekrose von nun an wesentlich foudroyanter vor sich als in den mit HS infizierten Kulturen. Bei der infizierten Hep-2-Kultur imponiert eine ausgeprägte Riesenzellbildung, während die Nierenzellkulturen vom Menschen, vom Affen und vom Kaninchen im Endstadium Syncytienformation aufweisen.

In der mit den Equine abortion virus (EAV) - Stämmen Ky-D und Army 183 infizierten Kaninchenzellkultur kommt es kaum zur Ausbildung von Riesenzellen. Die Zellen runden sich hier ab, schrumpfen etwas und sind auffallend dunkel pigmentiert (Abb.3). Nekrotische, von der Glaswand abgelöste Zellen hinterlassen auf dem Zellrasen immer größer werdende Höfe. Im Endstadium sind die Höfe nur durch perlschnurartig aufgereihte Zellen voneinander getrennt. Ebenso verhält sich die mit EAV infizierte menschliche Embryonalzellkultur, während Marmosetnierenzellen und Hep-2-Zellen große Riesenzellbildung mit z.T. syncytialen Charakter aufweisen (Abb.4).

Die mit Herpesvirus platyrrhinae (HP) infizierten Zellkulturen zeigen entweder Zellabrundung mit vereinzelt eingestreuten Riesenzelle und großer Hofbildung (wie bei der Hep-2-Zellkultur) oder ausgesprc chene Riesenzellbildung (wie bei den Nierenzellkulturen vom Rhesusaffen, Marmoset und Menschen). Syncytialformation wurde nur ganz selten beobachtet.

Die mit LK-Virus infizierten Kulturen sind durch ein äußerst spätes sichtbares Einsetzen und langsames Fortschreiten des CPE ausgezeich net. Erst am 4. Tag p.i. sieht man an einigen Stellen des Zellrase 4-8 einander berührende Zellen, die schwach oder gar nicht pigmentiert sind, sich abrunden und von der Glaswand ablösen. Erst in einem späteren Stadium kommt es zur Riesenzellbildung der Zellen, di unmittelbar die immer größer werdenden Höfe abgrenzen (Abb.5). Die Ausbildung von Syncytien wurde in keiner Zellkultur beobachtet.

) Art und Ausbildung intranukleärer Einschlußkörperchen (EK), welche die untersuchten Viren in verschiedenen Zellkulturen, nach Anwendung unterschiedlicher Fixierungs- und Färbemethoden, hervorrufen.

Die genauen zeitlichen Beziehungen zu den Gestaltänderungen innerhalb des Zellkerns haben wir nicht weiter beachtet, nachdem wir in Kontrollserien mit verschieden verdünntem Virusinokulat feststellten, daß sich die Veränderungen zwischen Infektion und völliger Nekrose gleichmäßig wiederholen, während das zeitliche Auftreten der Zellveränderungen vom Verdünnungsgrad des Virusinokulates abhängt. Die Infektion mit unverdünntem Virusinokulat hatte den Vorteil, daß zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. je ein bestimmtes Stadium der Zellveränderung vorherrschte, während bei verdünntem Virusinokulat alle Entwicklungsstadien nebeneinander zu sehen waren. Weiterhin stellt sich folgendes heraus:

1.) In den verschiedenen oben angegebenen Zellkulturen ergaben sich in der Art der Ausbildung der EK eines bestimmten Virus keine nennenswerten Unterschiede.

2.) Die Wahl des Fixierungsmittels dagegen und die Dauer der Fixierung waren ausschlaggebend für den zahlenmäßigen Anteil und die Intensität der Anfärbbarkeit der EK. In Zellen, die wir nur kurz mit Methylalkohol fixierten, sahen wir die typischen EK seltener als nach längerer Fixierung in Zenker-Lösung. (Bei den Vergleichsuntersuchungen fixierten wir deshalb einheitlich 2o Min. mit Zenker-Lösung).

3.) Verschiedene Kernfärbungen (Hämatoxylin-Eosin (HE) und Acridin-Orange (AO))stellten pathologische Veränderungen gleichartig dar.

4.) Ungeachtet des Zelltyps, der Färbung und im gewissen Rahmen auch der Fixierung, ergab sich für jedes der untersuchten Viren ein für das betreffende Virus konstanter Typ der Einschlußkörperausbildung, worüber jetzt im einzelnen berichtet werden soll:

Nach der Infektion mit Herpes simplex (HS) weisen vereinzelte Zellen schon 6 Std.p.i. eine Körnung des Chromatins auf. 18 - 24 Std. p.i. (Abb.6) werden die Kerne, die ein gekörntes Chromatin zeigen, und deren Nukleoli nicht mehr zu sehen sind, zahlreicher. EK vom Typ A (Cowdry, 1934) mit dem klaren Hof an der Zellkerngrenze treten nun deutlich in Erscheinung. Im Endstadium, kurz vor der völligen Nekrose, zeigen etwa ein Drittel aller Zellen EK vom Typ A.

Für die mit Pseudorabies (PR) infizierten Kultur ist eine Homogenisierung und feine Granulierung der Zellkerne, deren Nukleoli nicht mehr sichtbar oder an den Rand gedrängt sind, charakteristisch (Abb.7). Zur Ausbildung von EK, die entweder den ganzen Kern ausfüllen oder geschrumpft - als vom Typ A - sein können, kommt es nur vereinzelt, und die Anzahl dieser EK sind im Vergleich zu den mit HS und HP infizierten Kulturen wesentlich seltener.

Die mit Herpesvirus platyrrhinae (HP) infizierten Kulturen zeigen schon 6 Std.p.i. vereinzelte EK vom Typ A. Für die Mehrzahl der Zellen ist bis zur 18. Std.p.i. eine homogene Färbung des Kernes mit beginnender Abgrenzung des Chromatins charakteristisch (Abb.8). EK vom Typ A können in einem späteren Stadium sehr zahlreich sein.

In den mit Equine abortion virus (EAV) infizierten Kulturen erscheinen die Kerne etwas vergrößert und weisen feinkörnige bis grobe Granulationen auf;der Kern kann dabei diffus verfärbt sein,oder -wie es

meist der Fall ist - die stark anfärbbaren Granulationen heben sich von dem hellen, nicht anfärbbaren Grund ab (Abb.9). Zur Ausbildung vor EK vom Typ A kommt es nicht; ganz selten läßt der nur leicht getönte Kern an der Zellgrenze eine verwaschene Aufhellung vermuten (Abb.1o).

Die mit LK-Virus infizierten Kulturen zeigen in dem noch intakten Zellrasen, der im ungefärbten Präparat keinen CPE vermuten ließe, in höchstem Maße ausgeprägte, intensiv gefärbte, eosinophile EK vom Typ A. Anfangs sind diese in der Vielzahl schollenförmig im ganzen Kern verteilt, um sich später oft zu einem unregelmäßig geformten EK zusammenzuschließen, das fast den ganzen Kern ausfüllt (Abb.5). Die EK erscheinen ziemlich plötzlich - etwa 24 Std. p.i.-und sind praktisc in jedem Kern ausgeprägt.

Diskussion

Zu A.) Affinität der untersuchten Viren zu verschiedenen Gewebezellkulturen.

HS und PR zeigen in einer Reihe von Zellkulturen Virusmultiplikation. Es sei hier auf eine Arbeit von Stoker (1959) verwiesen, der die meisten in der Literatur beschriebenen Adaptationen dieser beiden Vertreter der Herpesviren an Zellkulturen zusammengestellt hat.

Die Angaben von Holmes et al. (1963, 1964) über die Adaptation des HP an verschiedene Gewebezellkulturen konnten bestätigt werden.

Die von Plumer und Waterson (1963) für das LK-Virus beschriebene Adaptation an Kaninchennierenkulturen ließ sich reproduzieren und gleichzeitig auf andere Gewebekulturen ausdehnen.

EAV scheint eine geringe Wirtsbreite zu haben. Von den Versuchstieren zeigen sich nur neugeborene syrische Hamster für eine Infektion mit EAV empfänglich (Anderson und Goodpasture, 1942). Randall (1953) konnte verschiedene Organe vom Pferd, nach der Maitland-Methode präpariert, infizieren. Shimizu (1957) gelang es, Gewebezellen von Pferdenieren zu infizieren. In unseren Versuchen konnten wir EAV nach etwa 1o Passagen an Kaninchennieren und an die anderen obengenannten Zellkulturen adaptieren. Hierauf gelang uns auch die Adaptation an Kaninch (Deinhardt, unveröffentlicht). Daß in den frühen Passagen nur ein geri ger Teil der Zellen einen CPE zeigte, ist wohl auf einen Selektionsprozess während des Adaptationsvorganges zurückzuführen. Von ähnlicher Beobachtungen berichtet Randall (1953).

Bei den vergleichenden Titrationen der untersuchten Viren in verschiedenen Gewebezellkulturen (Tabelle II) fällt auf, daß die einzelne Viren in Primärzellkulturen sehr gutes Wachstum zeigen und zwar in der Reihenfolge Kaninchennierenzellen, menschliche Nierenzellen, Marmosetnierenzellen. Die Titer in der diploiden Zellkultur sind im Verhältnis dazu leicht abgeschwächt, in der permanenten Zellkultur Hep-2 stark

abgeschwächt. Die Rhesusaffennierenzellkultur weist sehr unterschiedliche Titer auf. Diese Kultur wurde kommerziell bezogen und zeigte fast immer Kontamination mit einem hämadsorbierenden Agens, das wiederum durch Interferenz die Ergebnisse verfälscht haben mag.

Zu B.) CPE der untersuchten Viren in verschiedenen Gewebezellkulturen.

Unsere Beobachtungen über die Ausbildung der CPE stimmen zum größten Teil mit den in der Literatur beschriebenen überein (Sosa-Martinez et al., 1955, Scherer, 1953, Shimizu et al., 1963).

Scherer und Syverton (1954) konnten bei HeLa-Zellen, die sie vergleichend mit PR und HS infizierten, gleich unseren Beobachtungen, in der mit PR infizierten Kultur eine langsamere Ausbreitungsgeschwindigkeit des CPE beobachten, was in unseren Versuchen in den EAV-Kulturen und vor allem in den LK-Kulturen besonders ausgeprägt war.

In den letzten Jahren wurden von mehreren Autoren verschiedene HS-Stämme, wie auch PR- und Infectious Laryngotracheitis (ILT-) Virus-Stämme beschrieben, die auf die Gewebekultur gebracht, eine für jeden Stamm charakteristische Ausbildung des CPE hervorrufen.

Munk und Donner (1963) diskutieren in ihrer Arbeit die wesentlichsten Beiträge zu diesem Problem und berichten von eigenen Untersuchungen an 4o HS-Stämmen, bei denen sie - ähnlich unseren Ergebnissen - drei verschiedene CPE-Formen beobachten konnten, nämlich

1.) nur Zellabrundungen
2.) Zellabrundungen mit kleinen Syncytien (sog.Riesenzellen)
3.) großflächige Syncytien.

In allen dazu veröffentlichten Arbeiten ging man von sog. "Plaque-gereinigten" Stämmen aus, die ausschließlich eine der genannten charakteristischen CPE-Formen zeigten. Diese "Plaque-gereinigten" Stämme - auf verschiedene Wirtszellen gebracht - wiesen immer gleichartige CPE-Formen auf, wie Gray et al. (1958), Hoggan und Roizmann (1959), Schneweis (1962) und Munk und Donner (1963) zeigen konnten.

Bei unseren Untersuchungen arbeiteten wir mit Virusstämmen, die wir nicht mit Hilfe der Plaque-Methode reinigten - also gemischten Virusstämmen - die potentiell alle Arten der CPE-Ausbildung enthielten. Nach Beimpfung verschiedener Wirtszellen trat demnach einmal ein CPE mit syncytialen Charakter in den Vordergrund, ein andermal herrschte die Ausbildung von Riesenzellen vor, oder der Zellrasen zeigte hauptsächlich ein Abrunden der Zellen mit Degeneration einzelner Zellareale.

Die reine Ausbildung einer der genannten CPE-Formen konnte nicht immer beobachtet werden, es handelte sich lediglich um ein deutliches

Vorherrschen des einen oder anderen CPE-Typs in den verschiedenen Wirtszellen.

Zu C.) Art und Ausbildung intranukleärer Einschlüsse.

Sehr charakteristisch für Herpesviren ist, daß sie in Zellen epithelialer Herkunft intranukleäre Einschlüsse bilden. Seitdem Lipschütz diese 1921 das erste Mal für das Herpes simplex Virus beschrieb und Crouse et al. (1950) und später Wolman und Behar (1952) die grundlegenden histochemischen Veränderungen, die die infizierte Zelle durchmacht, aufklären konnten, sind zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden, die die Morphologie der Zellen in verschiedenen Stadien der Infektion beschreiben. Die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten differieren oft sehr voneinander:

Crouse et al. (1950) fanden in mit HS infizierten Kulturen äußerst zahlreiche Zellen mit typischen EK, während Scherer (1953)in L-Zellen, die er mit HS infizierte, nur wenige EK vorfand, und ihm eine Auflockerung des Chromatins für die meisten Zellen der infizierten Kultur charakteristisch erschien. Gildemeister et al. (1929)konnten bei 22 Passagen des HS-Virus in Kaninchenhoden keine EK nachweise

Reissig und Kaplan (1962) sahen in allen mit PR infizierten Zellen Kerneinschlüsse vom Typ A (Cowdry 1934), während Albrecht et al. (1963) in mit PR infizierten Kulturen im Kernplasma entweder eine homogene oder eine feine granuläre Struktur beobachteten; nur ganz vereinzelt traten in späten Stadien der Infektion typische EK auf. Kersting et al. (1958) konnten in Hühnerfibroblasten trotz guter Virusvermehrung keine EK entdecken.

In mit EAV infizierten Geweben beschreiben Westerfield und Dimock (1946) Zellen, die EK vom Typ A enthalten und andere Zellen, die grobe Granula aufweisen, während Randall (1953) neben Zellen, die Einschlüsse vom Typ A zeigen, auch solche sah, die den ganzen Kern ausfüllen.

Barski und Robineaux (1959) bezweifelten darum, ob die Infektion mit Herpesviren immer mit typischen EK einhergehen müsse. Dieser Frage gingen wir nach, indem wir die zur Diskussion stehenden Viren auf verschiedene Zellkulturen beimpften und zur Darstellung der Kernveränderungen verschiedene Fixierungsmethoden (Methylalkohol, Zenker, Formol) und verschiedene Färbemethoden (Hämatoxylin-Eosin und Acridin-Orange) anwendeten. Dabei ergab sich, daß verschiedene (weiter oben angeführte) Zellkulturen, wie auch unterschiedliche Färbemethode die Kernveränderungen gleichartig zur Darstellung brachten. Die Wahl des Fixierungsmittels und die Fixierzeit hingegen waren - in gewissem

Rahmen - verantwortlich für den zahlenmäßigen Anteil und die Intensität der Anfärbbarkeit der EK. In Zellen, die wir nur kurz mit Methylalkohol fixierten, sahen wir Zellkerne mit typischen EK seltener als nach längerer Fixierung in Zenker-Lösung. Eine Erscheinung, die Reissig und Melnick (1955) Barski und Robineaux (1959) Felgenhauer und Stammler (1962) mit ähnlichen, verschieden starken Fixierungsmitteln, beobachteten.

Interessant ist, daß in unseren Versuchen jedes der untersuchten Viren eine charakteristische und (wie sich durch mehrfach wiederholte Experimente ergab) konstante Kernveränderung zeigte: In den mit LK-Virus infizierten Kulturen waren die EK vom Typ A in allen Kernen (= loo%) in markantester Ausprägung zu finden. Körnung und Homogenisierung des Chromatins, wie es die mit HS und HP infizierten Zellen als Vorstadium zur EK-Bildung zeigten, konnten in den mit LK-Virus infizierten Kulturen nicht beobachtet werden. Die Kernveränderungen der mit HS und HP infizierten Kulturen ähnelten sich sehr, wenn auch in den mit HP infizierten Zellen die typischen EK etwas häufiger gesehen werden konnten als in den HS-Kulturen (25%). In den mit PR infizierten Zellen stellte eine grobe Granulation des Chromatins die vorherrschende Kernveränderung dar; EK vom Typ A waren spärlich verteilt (5%), jedoch stets vorhanden. Bei Zellen, die mit EAV infiziert wurden, war die Ausbildung typischer EK zumindest fragwürdig, während eine ausgeprägte Granulation des Chromatins die charakteristische Kernveränderung darstellte.

Zusammenfassung

Die Wachstumseigenschaften von 5 Herpesviren (Herpesvirus hominis, - suis, - platyrrhinae und Equine herpes virus Typ I und Typ II) wurden in verschiedenen Gewebezellkulturen untersucht. Alle Viren konnten an Primärkulturen (Nierenkulturen vom Mensch, Affen und Kaninchen), an diploide menschliche Embryonalzellen (human embryonic diploid cell strains) und an den permanenten Zellstamm Hep-2 adaptiert werden.

Der CPE war typisch für jedes Virus. Die Ausbildung verschiedenartiger CPE-Formen war in gewisser Rahmen von der verwendeten Zellkultur abhängig.

Intranukleäre Einschlußkörperchen waren charakteristisch für jedes Virus. Verschiedene Zellkulturen und unterschiedliche Färbemethoden brachten die Kernveränderungen gleichartig zur Darstellung; ihr Erscheinen war lediglich von der Fixierung abhängig.

Literatur

Anderson,K., E.W.Goodpasture: Infection of newborn Syrian hamsters with virus of mare abortion. Amer. J. Path. 18,555 (1942).

Andrewes,C.H.: Viruses of Vertebrates, Baltimore, 1964 (p. 211).

Aujeszky,A.: Über eine neue Infektion bei Haustieren. Zbl.Bakt.(Orig.) 32,353 (1902).

Barski,G., R.Robineaux: Evolution of Herpes Simplex cellular lesions observed in vitro by phase contrast microcinematography. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 101,632 (1959).

Cowdry,E.: Problem of intranuclear inclusion in virus diseases. Arch. Path. 18,527 (1934).

Crouse,H., H.Coriell, H.Blank, T.F.McNair Scott: Cytochemical studies on intranuclear inclusions of herpes simplex. J. Immunol. 65,119 (1950).

Deinhardt,F., J.B.Deinhardt: The Use of Platyrrhine Monkeys in Medical Research. Proc. Zoolog. Soc. London (1965, in Druck).

Dimock,W.W., P.Edwards: Is there a filterable virus of abortion in mares? Kentucky Agric. Exper. Sta. Bull. suppl. 333,297 (1933).

Doll,E.R., J.T.Bryans, W.H.McCollum, M.E.W.Croew: Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. Cornell Vet. 47,3 (1957).

Eagle,H., V.I.Oyoma, B.Levy: Amino acid requirements of normal and malignant human cells in tissue culture. Arch.Biochem. 67,432 (1957).

Felgenhauer,K., A.Stammler: Die histochemisch nachweisbaren Veränderungen in der mit dem Virus des Herpes simplex inokulierten Zellkultur. Arch. Ges. Virusforsch. 12(2),223 (1962).

Gildemeister,E., E.Hagen, L.Scheele: Über das Verhalten des Herpesvirus in der Gewebekultur. Zbl. Bakt. (Orig.) 114,309 (1929).

Gray,A., T.Tokumaru, T.F.McNair Scott: Different cytopathogenic effects observed in HeLa cells infected with herpes simplex virus. Arch. Ges. Virusforsch. 8,59 (1958).

Hass,G.M.: Hepato-adrenal necrosis with intranuclear inclusion bodies: report of case. Amer. J. Path. 11 ,127 (1935).

Hayflick,L., P.S.Moorhead: The serial cultivation of human diploid cell strains. Exper. Cell Res. 25(3),585 (1961).

Hoggan,M.D., B.Roizman: The isolation and properties of a variant of herpes simplex producing multinucleated giant cells in monolayer culture in the presence of antibody. Amer.J.Hyg. 70,208 (1959).

Holmes,A.W., R.E.Dedmon, F.Deinhardt: Isolation of a new herpes-like virus from South American marmosets. Fed. Proc. 22(2),334 (1963).

Holmes,A.W., R.G.Caldwell, R.E.Dedmon, F.Deinhardt: Isolation and characterization of a new herpes virus. J.Immunol. 92,602 (1964).

Kersting,G., B.v.Kerékjartó und B.Rhode:Über charakteristische Zellveränderungen in der Kultur epithelialen Gewebes nach der Infektion mit Aujeszky- und B-Virus. Zschr. Naturforsch. 13 b,160 (1958).

Lipschütz,B.; Zur kenntnis der Ätiologie des Herpes febrilis. Wiener Med. Wschr. 71,231 (1921).

Melnick,J.L., M.Midulla, I.Wimberly, J.G.Barrera-Ora, B.M.Levy: A new member of the herpes virus group isolated from South American marmosets. J.Immunol. 92,596 (1964).

Moore,E.A., L.Sabachewsky, H.W.Toolan: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Res. 15,598 (1955).

Morgan,J.F., H.J.Morton, R.C.Parker: Nutrition of animal cells in tissue culture. I.Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 73,1 (1950).
Munk,K., D.Donner: Cytopathischer Effekt und Plaque-Morphologie verschiedener Herpes-simplex-Virus-Stämme. Arch. Ges. Virusforsch. 13,529 (1963).
Plummer,G., A.P.Waterson: Equine herpes virus. Virol. 19,412 (1963).
Randall,C.C., F.W.Ryden, E.R.Doll, F.S.Schell: Cultivation of equine abortion virus in fetal horse tissue in vitro. Amer. J. Path. 29,139 (1953).
Randall,C.C.:Propagation of EAV in tissues of other animals. Fed. Proc. 13,441 (1954).
Reissig,M., A.S.Kaplan: The morphology of noninfective PR virus produced by cells treated with 5-Fluorouracil. Virol. 16,1 (1962).
Reissig,M., J.L.Melnick: The cellular changes produced in tissue cultures by herpes B virus correlated with the concurrent multiplication of the virus. J. Exper. Med. 101,341 (1955).
Scherer,W.F.: The utilization of a pure strain of mammalian cells (Earle) for the cultivation of viruses in vitro. I.Multiplication of pseudorabies and herpes simplex virus. Amer.J.Path.29,113 (1953)
Scherer,W.F., J.T.Syverton: The viral range in vitro of a malignant human epithelial cell (strain HeLa). I.Multiplication of Herpes simplex, Pseudorabies and vaccinia virus. Amer. J. Path. 30,1057 (1954).
Schneweis,K.E.: Der cytopathische Effekt des Herpes-simplex-Virus. Stammdifferenzen, Stabilität, Einfluß von Immunserum und Beziehungen zur Pockengröße. Zbl. Bakt. (Orig.) 186,411 (1962).
Shimizu,T., R.Ishizaki, J.Kono, S.Ishii, M.Matumoto: Propagation of equine abortion virus in horse kidney tissue culture. Jap. J. Exper. Med. 27,175 (1957).
Shimizu,T., R.Ishizaki, M.Matumoto: Infection and growth of equine rhinopneumonitis virus in cultured horse kidney cells. Jap. J. Exper. Med. 33,113 (1963).
Sosa-Martinez,J., L.Guitierrez-Villegas, R.M.Sosa: Propagation of herpes simplex virus in tissue cultures of rabbit kidney. J. Bact. 70,391 (1955).
Starr,T.J., M.Pollard, Y.Tanami, R.W.Moore: Cytochemical studies with Psittacosis virus by fluorescence microscopy. Texas Reports Biol. Med. 18,501 (1960).
Stoker,M.G.P.: Growth studies with herpes virus. In: Virus Growth and Variation. Ninth Sympos. Soc. Gener. Microbiol. p. 142. Cambridge University Press,London, 1959.
Westerfield,C., W.W.Dimock: The Pathology of Equine Abortion Virus. J. Amer. Vet. Med. Ass. 91,101 (1946).
Wilner,B.I.: A classification of the major groups of human and lower animal viruses. p.16. Cutter Lab., Berkeley, Calif., 1964.
Wolman,M., A.Behar: Cytochemical evidence for the nature of Herpes simplex inclusion bodies. J. Infect. Dis. 91,63 (1952).
Youngner,J.S.: Monolayer tissue culture. I.Preparation and standardization of suspensions of trypsin dispensed monkey kidney cells. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 85,202 (1954).

Zu Abb. 1 - 5: Phasenkonstrastaufnahmen ungefärbter infizierter Zellkulturen in etwa 80 - facher Vergrößerung.

Abb.1: Herpes simplex auf Hep-2-Zellkultur. Die infizierten Zellen sind abgerundet und stark pigmentiert. Vereinzelt kommt es zur Riesenzellbildung.

Abb.2: Herpes simplex auf Kaninchennierenzellen. Ausgeprägte Syncytienformation.

Abb.3: Equine Abortion Virus auf Kaninchennierenzellen. Die Zellen sind klein, abgerundet und stark pigmentiert. "Hofbildung" im Zellrasen.

Abb.4: Equine Abortion Virus auf Marmosetnierenzellen. Syncytienformation.

Abb.5: LK-Virus auf Marmosetnierenzellen. "Hofbildung" im Zellrasen mit wenigen Riesenzellen.

Zu Abb. 6 - 11: Kernfärbungen infizierter Zellkulturen.

Abb.6: Herpes simplex auf Kaninchennierenzellen, Vergr.: 500-fach, HE-Färbung. Etwas rechts der Bildmitte ein noch nicht pathologisch veränderter Zellkern. Die meisten Kerne zeigen eine aufgelockerte Struktur und erscheinen im ganzen aufgehellt mit dunklen, feinkörnigen Granulationen. Zwei Einschlußkörperchen (EK) vom Typ A in der oberen Bildhälfte.

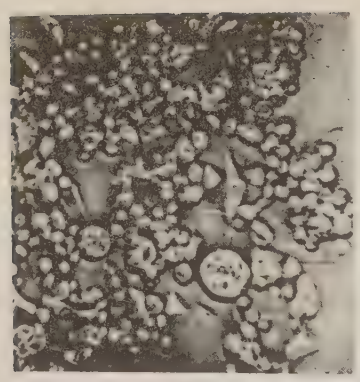
Abb.7: Pseudorabies auf Kaninchennierenzellen, Vergr.: 800-fach, HE-Färbung. Links im Bild drei normale Zellkerne, rechts drei Kerne, die heller erscheinen und deutlich granuliert sind. Die Nukleoli sind in diesen Kernen nicht mehr sichtbar.

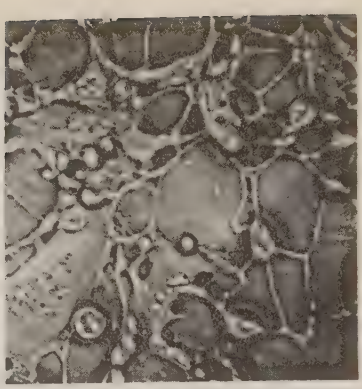
Abb.8: Herpesvirus platyrrhinae auf Hep-2-Zellen, Vergr.: 1000-fach, Acridin-Orange-Färbung. Rechts unten ein normaler Zellkern. Die meisten der infizierten Kerne im Bilde sind homogen angefärbt und zeigen Granulationen. Drei Zellkerne mit EK vom Typ A.

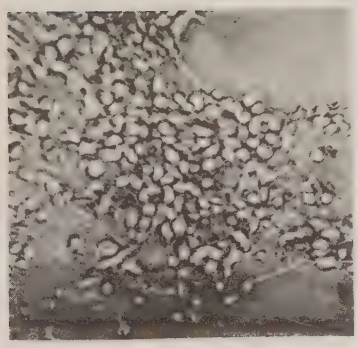
Abb.9: EAV auf menschlichen Nierenzellen, Vergr.: 500-fach, HE-Färbung. In der Bildmitte rechts ein normaler Zellkern. Die meisten infizierten Kerne zeigen fein- bis grobkörnige Granulationen.

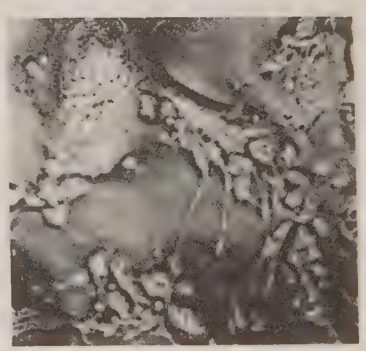
Abb.10: EAV auf menschlichen Nierenzellen, Vergr.: 500-fach, HE-Färbung. Zur Ausbildung typischer EK kam es nicht. Nur selten läßt der nur leicht getönte Kern an der Zellkerngrenze eine verwaschene Aufhellung vermuten.

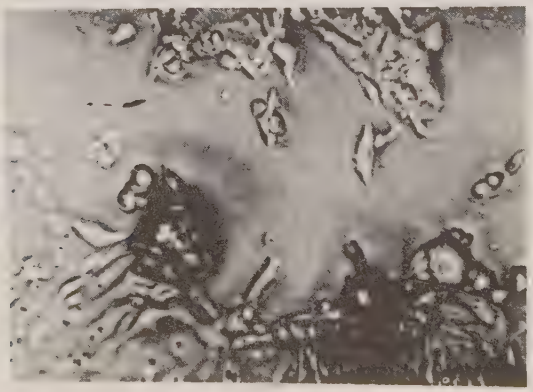
Abb.11: LK-Virus auf Kaninchennierenzellen, Vergr.: 800-fach, HE-Färbung. Intensiv gefärbte eosinophile EK vom Typ A.











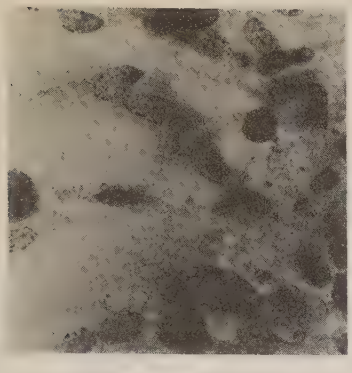


Abb.6

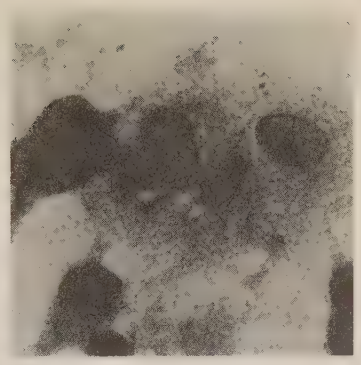


Abb.7

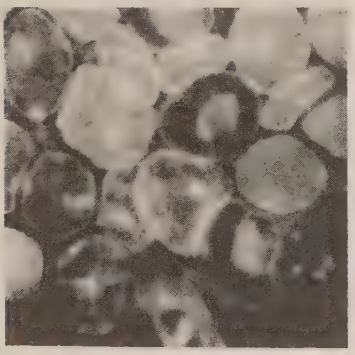


Abb.

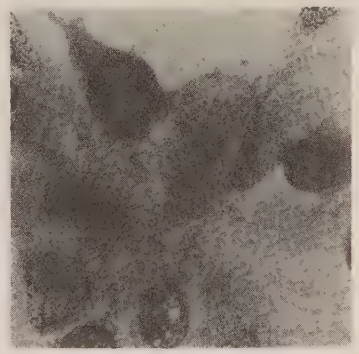


Abb.

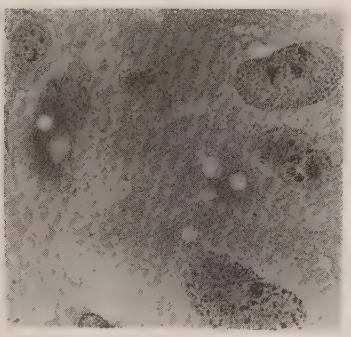


Abb.10

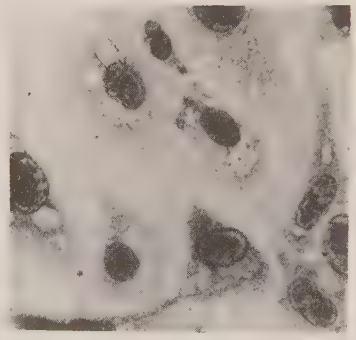


Abb.11

Herrn Prof. Dr. D e i n h a r d t , Chicago, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, daß er mich mit einem Aufgabenbereich betraut hat, bei dem ich die wesentlichsten Untersuchungstechniken eines virologischen Laboratoriums erlernen konnte. Seine großzügige Unterstützung und wertvollen Anregungen waren mir bei der Durchführung der Experimente von allergrößtem Nutzen.

Herrn Prof. Dr. S c h m i d t , Berlin, möchte ich sehr danken, daß er mir die Gelegenheit gegeben hat, einzelne in Chicago begonnene Versuche in seinem Institut fortzuführen und mir dadurch die Vollendung der vorliegenden Arbeit ermöglicht hat.

Lebenslauf

Ich wurde als Sohn des Kaufmanns Gerhard Tischendorf und seiner Ehefrau Elfriede Tischendorf, geb. Fritzsche, am 24. August 1940 in Leipzig geboren.

Nach der Umsiedlung nach Fürth/Bay. im Jahre 1946 besuchte ich dort bis 1950 4 Jahre die Volksschule und anschließend 9 Jahre die Oberrealschule Fürth/Bay., an der ich im Jahre 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Im Herbst 1959 immatrikulierte ich mich an der Universität Erlangen für das Studium der Medizin. Nach 2 Semestern legte ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum) und nach weiteren 3 Semestern die ärztliche Vorprüfung (Physikum) ab. In den anschließenden 6 klinischen Semestern studierte ich an den Universitäten Freiburg (Brsg.), Wien, Berlin und am Klinikum Essen der Universität Münster, wo ich im Sommer 1965 die ärztliche Prüfung (Staatsexamen) abgelegt habe.

In den Jahren1962, 1963 und 1964 arbeitete ich während der Semesterferien jeweils 3 Monate im Department of Microbiology des Presbyterian - St.Luke's Hospital in Chicago, U.S.A. als "Research Associate".

Seit Oktober 1965 bin ich als Medizinalassistent an der I. Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses in Nürnberg tätig.

Peter Tischendorf